意蜂与中蜂血淋巴蛋白质成份的研究

李绍文　杨俭美　孟玉萍　张宗炳
（北京大学生物系）

李举怀　　骆尚骅
（北京市农业科学院）　（北京市养蜂研究所）

摘要　本实验用聚丙烯酰胺凝胶电泳分析了两个蜂种的血淋巴蛋白质成分。意蜂和中蜂都是 *Apis* 属，血淋巴蛋白质电泳谱相似。但是，两蜂种以及同一蜂种不同级别、不同发育阶段的电泳谱又各有特点。根据实验，我们把成年蜂血淋巴电泳谱分为 11 条带，雌蜂电泳谱上的带 5 是卵黄原蛋白；雄蜂卵黄原蛋白含量很少或测不出。

用 Thorun 方法，在聚丙烯酰胺凝胶平板电泳上测得意蜂卵黄原蛋白的分子量为 185,000。

前　言

不同物种蛋白质的差别是近年来分类学的研究课题之一。动物的营养物质和调节物质都是通过血液输送的，因此，血液中蛋白质成分亦显示出物种的特点，并随发育期而改变。 刘如笋等（1979）研究了几种鸭卵蛋白的凝胶电泳谱，据此探讨了北京鸭的起源问题。Frair 等（1979）对 200 个龟血清进行了比较研究，证实了解剖学上相似的龟，血清学上也极相似。 Rutz（1974）用凝胶电泳和免疫扩散的方法，研究了意蜂的血淋巴蛋白质成分，查出雌性蜂有一种雄性所没有的蛋白质，他认为这就是卵黄原蛋白（vitellogenin）。Engels（1973）、Bounias 等（1975）对不同种或不同品系的蜜蜂血淋巴蛋白质成分也作了比较研究，结果均有出入。本实验用凝胶电泳比较了意蜂（*Apis mellifera*）和中蜂（*Apis cerana*）两个种之间血淋巴蛋白质的差别，并用 Thorun 方法（参见 Manrer, 1971）初步测定了卵黄原蛋白的分子量。

材 料 和 方 法

材料　意蜂取自北京市农业科学院养蜂室的实验蜂群，中蜂系 1980 年春从湖南省平江县购入。

取样　剪去成年蜂一侧复眼，插入微量注射器吸取血淋巴；或将玻璃毛细管插入腹部 3—4 节节间膜吸取血淋巴。幼虫用解剖针刺破表皮，血淋巴即渗出，以微量注射器吸取。 再向上述血淋巴液中加入 4 倍体积的样品稀释液（稀释 8 倍的浓缩胶缓冲液与等体积的 40% 蔗糖溶液混合，加入少许溴酚蓝，即为样品稀释液）。

电泳方法　采用 Davis 的高 pH 不连续系统，分离胶浓度为 7%，交联剂百分比为

本文于 1981 年 2 月收到。

2.6%，pH8.9；浓缩胶浓度为2.5%，交联剂百分比为20%，pH6.7；电极缓冲液为Tris-甘氨酸缓冲液，pH8.3。每个直径为6毫米的凝胶管中加入10—20微升血淋巴稀释液。开始电泳时，每管电流1—2毫安，染料进入分离胶后，加大到每管4—5毫安。电泳结束后取出胶柱，放入考马斯亮蓝(R_{250})固定染色液内染色6—8小时，用7%乙酸溶液脱色。(固定染色液：甲醇100毫升，三氯醋酸25克，磺基水杨酸25克，R_{250} 0.1克，加蒸馏水至500毫升。)

扫描 染色胶柱在色谱扫描仪上扫描，波长为550毫微米。

卵黄蛋白原的提取 仿龚和等的方法(1980)，稍有改变，从蜂王卵巢中提取。

分子量测定 用Thorun氏测商法，其公式为：

$$\log \frac{m_1}{m_2} = k_1 MW + k_2$$

式中m_1为蛋白质在较低浓度凝胶中的电泳迁移率，m_2为该蛋白质在较高浓度凝胶中的电泳迁移率，MW为该蛋白质的分子量。用平板凝胶电泳测出参考蛋白质和卵黄原蛋白在浓度为6%凝胶中的相对迁移率m_1和浓度为8%的胶中的相对迁移率m_2，以参考蛋白质的$\log \frac{m_1}{m_2}$对分子量(MW)作图，得到标准曲线。根据卵黄原蛋白的$\log \frac{m_1}{m_2}$，从标准曲线上查出其分子量。

结 果

一、意蜂的血淋巴蛋白质电泳图谱 我们把意蜂工蜂的血淋巴电泳谱看作是两个蜂

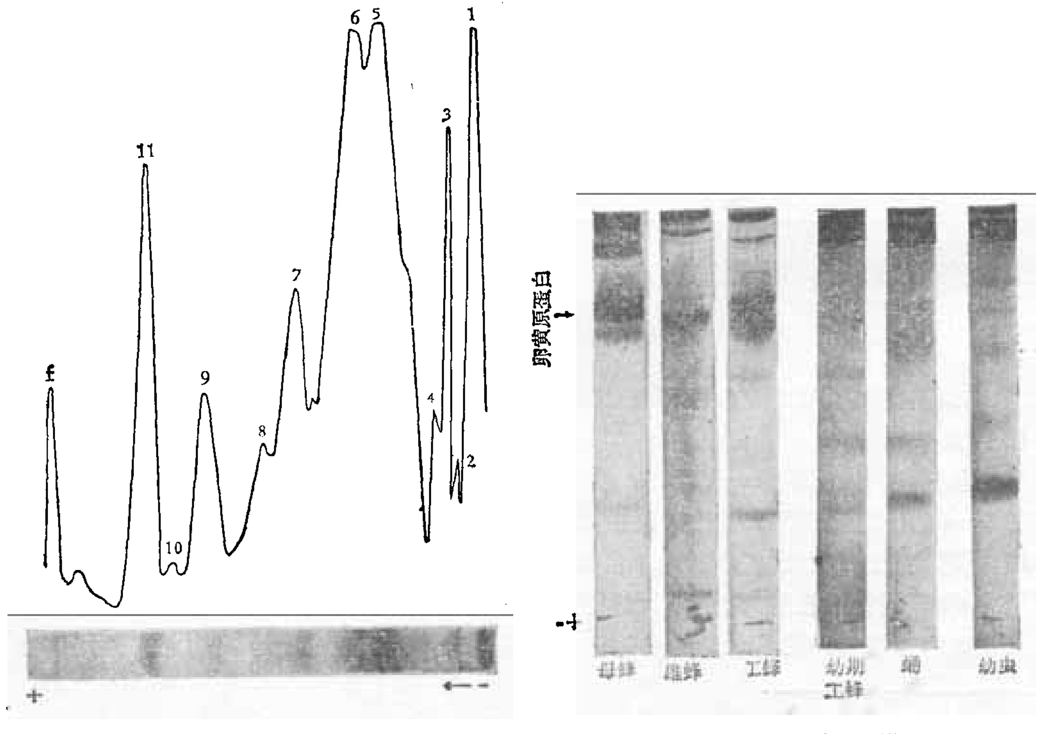


图1 意蜂工蜂电泳及扫描图谱

图2 *A. mellifera* 电泳图谱

种成年蜂的典型图谱，参照它的扫描曲线图，将其分为 11 条带。

在这 11 条带中，带 1、3、5、6 和 11 比较深而宽。带 2、4 和 7、8、9 则比较浅和窄。带 f 为指示染料带，走在最前面。有时在这些带之间，还可以看到几条不明显的带。

由图 2 可看出，三个级别成年蜂的带 5 有明显不同，雌性蜂的带 5 颜色深而宽，而蜂王又较工蜂多，雄性蜂的带 5 很窄，这说明带 5 是与性别有关的。在昆虫血淋巴中，和性别有关的蛋白质主要是卵黄原蛋白。在不同的胶浓度下，我们又对带 5 进行进一步的分析，发现在 9% 胶浓度时，工蜂的带 5 仍为一条明显的带，而雄蜂在与工蜂带 5 相应的位置上，没有或仅有一条很浅的带（图 3）。

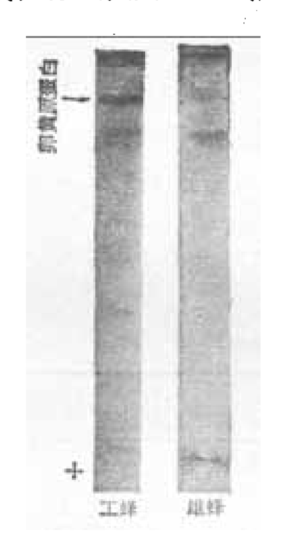


图 3　意蜂凝胶浓度 9%

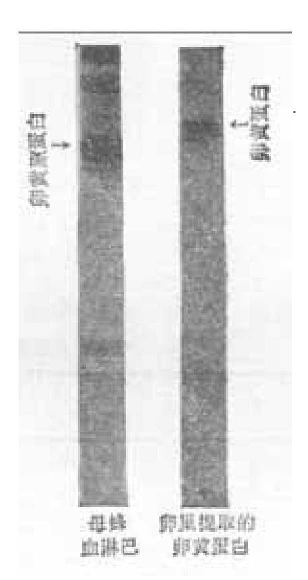


图 4　意蜂卵黄原蛋白（胶浓度 7%）

用冷蒸馏水沉淀方法从意蜂蜂王卵巢提出的卵黄蛋白在凝胶电泳时与血淋巴中卵黄原蛋白的位置相近，但迁移速率稍慢（图 4）。

和成年工蜂相比，幼期工蜂的带 5，6 都比较浅，说明这两种蛋白质的量，在一定时期内随着日龄的增长而增加。总的说来，蛹期的血淋巴蛋白质条带比较多，在这些带之间，还有几条不十分明显的带。蛹期的带 11 比幼虫期的浅而窄，但比成虫的宽和深些。此外，蛹期的电泳谱通常还多出一条带 12，这是一条弱而浅的带。幼虫血淋巴蛋白质的电泳谱主要特点是带 11 特别宽和深，这成为幼虫血淋巴电泳谱的一个显著标志。

二、中蜂血淋巴蛋白质电泳图谱　中蜂的血淋巴蛋白质电泳图谱和意蜂相似。仿照意蜂，也可把它分为11条带。

由图 5 可看出，三个级别成年蜂的带 5 也随性别不同而不同。雄蜂的窄而浅，雌蜂则宽而深。蜂王又较工蜂的宽和深。中蜂幼年工蜂带 5，6 都较浅，成年工蜂带 10，11 几乎消失。在 7% 胶浓度时，中蜂蜂王的带 6 显然又分成两条，这和意蜂蜂王的带谱是不同的。

三、雌性蜂卵黄原蛋白分子量测定　我们用 Thorun 氏测商法测定了雌性蜂卵黄原蛋白的分子量。在平板电泳上，凝胶浓度为 6% 和 8% 的条件下，测得意蜂雌性蜂的卵黄

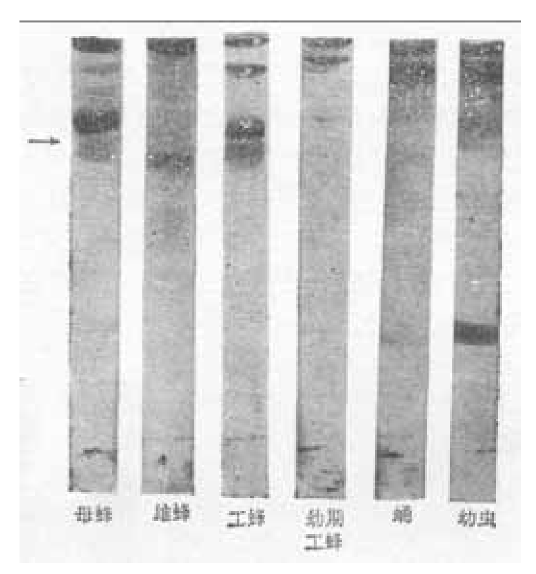


图 5 中蜂 (*A. cerana*) 电泳图谱

原蛋白与参考蛋白质的相对迁移率如表 1。

表 1 几种蛋白质的分子量和电泳迁移率

蛋白质种类	分子量	m_1(6%)	m_2(8%)	m_1/m_2	$\log m_1/m_2$
人血清清蛋白单体	69,000	0.60	0.55	1.18	0.07
人血清清蛋白二聚体	138,000	0.44	0.30	1.47	0.17
人血清清蛋白三聚体	207,000	0.30	0.16	1.88	0.27
高峰淀粉酶	51,000	0.73	0.66	1.10	0.04
鸡卵清蛋白	43,000	0.71	0.70	1.01	0.01
意蜂卵黄原蛋白		0.25	0.14	1.78	0.25

以参考蛋白质的 $\log m_1/m_2$ 对分子量作图，得到标准曲线。根据卵黄原蛋白 $\log m_1/m_2$ 值，从标准曲线上查得其分子量为 185,000。用同样方法测得中蜂卵黄原蛋白的分子量为 160,000 左右。

讨 论

一、卵黄原蛋白曾在许多昆虫中找到，如沙蝗 (*Schistocerca gregaria*) (Pill, 1962)，天蚕蛾 (*Hyalophora cecropia*) (Pan, 1969)，美洲蜚蠊 (*Periplaneta americana*) (Pan, 1969)，多种蜜蜂 (Rutz, 1974; Engels, 1973, 1975) 等。我们的工作也证实了蜜蜂雌性蜂（蜂王及工蜂）有这种蛋白存在（凝胶电泳带 5），并同卵巢中提取的卵黄蛋白进行了比较。这一条带在幼年蜂王中较浅，随着生长发育，这条带变宽变深。工蜂是卵巢发育不全的雌性蜂，在正常情况下，它们没有生殖能力，但当蜂群失王时，它们可以在短期内产下未受精卵，由此可见，工蜂具有生殖潜力，因而在血淋巴中存在一定量的卵黄原蛋白，但含量较蜂王要少。

一般均报道雄蜂中没有卵黄原蛋白 (Rutz, 1974; Engels, 1973)。从我们的试验结

果还不能作出结论。因为所用凝胶浓度不同时，结果不同：用 7% 浓度的凝胶，雄蜂中有较多的个体出现一条很浅的带 5；但用 9% 浓度的胶，一般不出现带 5；用 5% 胶时，也有少数个体显示出有一条极浅的带 5。Engels (1974) 曾报道，双倍体雄蜂有卵黄原蛋白，但自然产生的双倍体雄蜂很少，这不一定能解释我们的实验结果。很可能在 5% 和 7% 胶中雄蜂出现的带 5 乃是迁移率与卵黄原蛋白相近的其它蛋白，而 9% 的胶对二者的分离效果较好，这个蛋白质的区带与卵黄原蛋白的区带分开了。这与龚和 (1980) 等对七星瓢虫的工作有些相似。他们用凝胶电泳也测出雄虫中有一条弱的、与卵黄原蛋白迁移率相似的带，但用免疫扩散法却测不出雄虫中有卵黄原蛋白存在。免疫扩散法有更高的特异性，显然更能说明问题。因此，我们的结果还必须用其它方法验证。

目前，许多文献都认为昆虫卵和卵巢中卵黄蛋白 (vitellin) 和血淋巴中卵黄原蛋白的差异用电泳和免疫学方法测不出。但有些报告 (Hagedorn, 1979) 指出二者在脂肪含量和蛋白质亚基的组成上有差异。从我们的实验看，卵黄蛋白在电泳时迁移率比卵黄原蛋白稍低，也说明二者有差异。

二、Engels (1973, 1975) 等报道，4 种蜜蜂 (*A. mellifca*、*A. dorsata*, *A. florea* 及 *A. cerana*)的血淋巴用醋酸纤维薄膜电泳分析，其蛋白质区带的数目和深浅十分相似，只有几条带的迁移率略有差异。在我们的实验中，发现中蜂和意蜂血淋巴蛋白质凝胶电泳图谱有相当的差异。意蜂的成年工蜂有带 10 及带 11，而中蜂工蜂这两条带几乎完全消失；在意蜂蜂王带 6 的位置上，中蜂蜂王有两条带。这是两个主要的区别。

三、从图 2 和图 4 可以看出，蜜蜂各个发育阶段的血淋巴蛋白质电泳图谱是不同的。有两点值得提出：

1. 幼虫的血淋巴蛋白质谱上有一条带(相应于成年蜂带 11 位置)，这条带在幼虫中特别明显，到蛹期减弱，到成虫期更弱。似乎对幼虫是特异的，可能与生长有关。

2. 蛹期的血淋巴蛋白质条带比较多，说明蛋白质种类增多，但量均不多，可能是蛹期正处在由幼虫到成虫的过渡时期，各种组织正发生分解与新的合成，相应地产生了许多分解的蛋白质及新合成的蛋白质。蛹期通常还多一条带 12。

四、我们测定意蜂卵黄原蛋白的分子量为 185,000。Engels 用纤维胶块(cellogel block)测定意蜂的卵黄原蛋白分子量为 350,000；而用聚丙烯酰胺凝胶电泳测定其分子量则为 100,000。三个数据差别都很大。故意蜂卵黄原蛋白的分子量，还需用其它方法测定。

最后还需指出，实验中有时发现相同级别、相同发育阶段的不同个体，在电泳谱上也有某些差异，有时差异还比较大。作为一个物种，蜜蜂是自然杂交，品种比较混杂，因而个体间存在较大的差异是可能的。这也给分析实验结果带来一些困难。

参　考　文　献

刘如笋等　1979　鸭属中几种鸭卵蛋白质的比较。动物学报 **25**(3): 288—90。

龚　和等　1980　七星瓢虫的卵黄发生：卵黄原蛋白的发生和取食代饲料的影响。昆虫学报 **23**(3): 252—7.

Bounias, M. 1975 Compared analysis of the main protein fractions of haemolymph of different bee races. *In*: "The XXVth International Apicultural Congress of Apimonia." p. 257—9.

Engels, W. 1973 Evolution of the protein spectra in the haemolymph, a physiological feature of the development of female castes in the 4 real species of *Apis*: *florea*; *dorsata*, *cerana* and *mellifera*. *In*: "XXIV International Apicultural Congress of Apimodia." p. 327—32.

Engels, W. 1974 Occurence and significance of vitellogenins in female castes of social Hymonoptera. *American Zoologist* **14**(4): 1229—37.

Engels, W. 1975 Partcularities of protein spectra of haemolymph of *Apis* mellifera African races: *adansonii* and *capensis* *In*: "The XXVth International Apicultural Congress of Apimodia," p. 257.

Frair, W. 1979 动物分类与生物化学——应用血清学鉴定龟科的亲缘关系。生物科学动态 **4**: 91—3。

Hagedorn, H. H. 1979 Vitellogenin and vitellin in insects. *Annual Review of Entomology* **21**: 475—505.

Maurer, H. R. 1975 Disc elctrophoresis and related techniques of poyacrylamide gel electrophoresis. p. 8—15.

Pen, M. L. 1969 Vitellogenin blood protein synthesis by insect fat body. *Science* **165**: 393—4.

Pill, L. 1962 Neurosecretory control of haemolymph protein concentration during ovarian development in the desert locust. *J. Ins. Physiol.* **8**: 609—19.

Rutz, W. 1974 The occurence of vitellogenin in workers and queens of *Apis mellifera* and the possibility of its transmission to the queen. *J. Ins. Physiol.* **20**: 897—900.

STUDIES ON THE HAEMOLYMPH PROTEIN PATTERN OF TWO SPECIES OF HONEYBEES, *APIS MELLIFERA* AND *A. CERANA*

LI SHAO-WEN, YANG QIEN-MEI, MENG YU-PIN, J. T. CHANG

(Department of Biology, Peking University)

LI JU-HUAI

(Peking Academy of Agricultural Sciences)

LO SHANG-HUA

(Institute of Apiculture. Academy of Agricultural Sciences)

The haemolymph protein patterns of two species of honeybees, *Apis mellifera* and *Apis cerana* were investigated with polyacrylamide gel disc electrophoresis and were shown to be quite similar. The haemolymph protein pattern of the worker bees of *Apis mellifera* shows eleven bands typically; there are certain differences in different castes, developmental stages and between the species. Band V of the female bees is vitellogenin which is either absent in the drones or present only in traces. This band of vitellogenin is most prominent in the egg-laying queens. Band XI is a larval protein, most prominent in the larval stage, gradually disappears in the adult stages of *Apis cerana,* but is still present in the adult stages of *Apis mellifera.* The hamolymph protein pattern of the pupa is characterised by having many indistinct bands, probably representing disintegrating proteins during histolysis. The molecular weight of the vitellogenin of *Apis mellifera* was determined to be 185,000 with Thorun's method.